

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | F I | |
|-----------------------------------|-------|---------------|---------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| A 6 1 K 35/12 | | A 6 1 K 35/12 | |
| 38/00 | A A B | 45/00 | |
| 38/22 | | 48/00 | A D U |
| 45/00 | | C 1 2 N 5/00 | B |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平8-512390
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)10月9日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)4月9日
 (86) 国際出願番号 P C T / F R 9 5 / 0 1 3 1 3
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 1 1 2 7 8
 (87) 国際公開日 平成8年(1996)4月18日
 (31) 優先権主張番号 9 4 / 1 2 0 7 8
 (32) 優先日 1994年10月10日
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 ニューロテック エス エイ
 フランス 91893 オルセ セデックス
 バッティマン デ リュ ジャン ロスタ
 ン 2 バルク クラブ オルセ
 (72) 発明者 シャプロ ナタリ
 フランス 75013 パリ、リュ ジャンヌ
 ダルク、10
 (72) 発明者 クロ ビーエルーオリピエ
 フランス 78610 オファルジ、リュ ド
 ウ ベレ、9
 (74) 代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内皮脳細胞の不死系とその治療上の適用

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類の内皮脳細胞の任意に改変された不死系、ならびに予防又は治療用、特に脳腫瘍を含む一次及び二次の神経系もしくは精神系疾患の処置用医薬、及び家畜の成長と再産生の刺激用医薬としての適用に関する。本発明は、該細胞系の作製法にも関する。開示された哺乳類の内皮細胞系は、分化内皮脳細胞の以下の特徴、内皮マーカーの発現、血管作用性物質の分泌、主要組織適合性複合体(MHC)分子の発現、ホルモンレセプターの発現、及び密着結合の存在の少なくとも1つを安定的に表す不死の内皮脳細胞からなり、該細胞系は、少なくとも1つの選択可能な遺伝子と任意に結合するウイルス又は細胞の癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含む核酸フラグメント、及び少なくとも1つの選択可能な遺伝子と少なくとも1つのマーカー遺伝子と任意に結合するポリペプチド、タンパク質又はウイルスベクターのコード配列を含む発現ベクターからなり、それらは、インビボで宿主哺乳類の脳血管に組込み、該ペプチド、該タンパク質又は該ウイルスベクターを産生する。

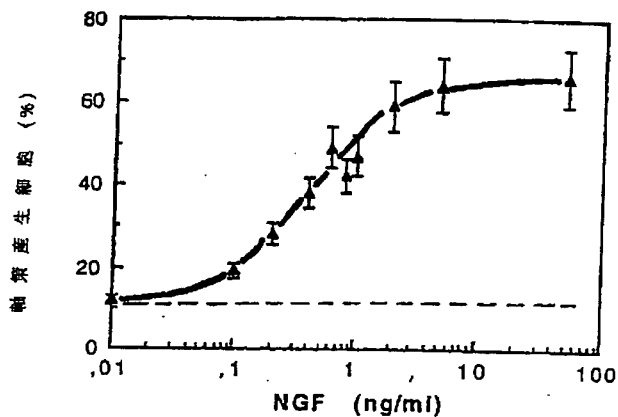


図 2

【特許請求の範囲】

1. 哺乳類の内皮細胞系が、分化内皮脳細胞の以下の特徴：

- 内皮マーカーの発現、
- 血管作用性物質の分泌、
- 主要組織適合性複合体(MHC)分子の発現、
- ホルモンレセプターの発現、及び
- 密着結合の存在、

の少なくとも1つを安定的に表す不死化内皮脳細胞からなり、適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子との組み合わせでの、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の不死化フラグメントの少なくとも1つからなる核酸フラグメント、及び適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子と、適切な場合に少なくとも1つのレポーター遺伝子との組み合わせでポリペプチド、タンパク質又はウイルスベクターのコード配列を含む発現ベクターとからなり、かつインビボで宿主哺乳類の脳血管に組み込み、該ペプチド、該タンパク質又は該ウイルスベクターを産生し得ることを特徴とする哺乳類の内皮細胞系。

2. 癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含有する核酸フラグメントが、ネイオマイシン耐性遺伝子とSV40 T癌遺伝子のフラグメントを含むことを特徴とする請求項1に記載の内皮細胞系。

3. 癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含有する核酸フラグメントが、アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオ

マイシン耐性遺伝子を含むことを特徴とする請求項1に記載の内皮細胞系。

4. 該発現ベクターがレトロウイルスベクターであり、詳しくはMGFベクターであることを特徴とする請求項1～3いずれか1つに記載の内皮細胞系。

5. レトロウイルスベクターが、MFG-NBベクターであることを特徴とする請求項4に記載の内皮細胞系。

6. ポリペプチド又はタンパク質のコード配列が、酵素、酵素阻害剤、サイトカイン、ニュートロピン、神経伝達物質、生長因子、毒素、抗代謝物、神経ホルモン、ガングリオシド、抗生物質、血栓崩壊性因子、凝固因子、血管拡張又は血管

収縮神経因子、低又は高コレステロール血症因子、及び高又は低血糖因子をコードする配列から選択されることを特徴とする請求項1~5のいずれか1つに記載の内皮細胞系。

7. 脳の毛細管の内皮細胞からなることを特徴とする請求項1~6のいずれか1つに記載の内皮細胞系。

8. 不死化フラグメントとして、アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子、及び発現ベクターとして β -ガラクトシダーゼをコードするnls-lacZ遺伝子含有MFG-NBレトロウイルスベクターを有利に含むこと特徴とする請求項1~7のいずれか1つに記載の内皮細胞系。

9. パスツール研究所により保管される国立微生物培養コレクションに1994年10月10日付けの番号I-1481で寄託していること特徴

とする請求項8に記載の内皮細胞系。

10. 不死化フラグメントとして、アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子、及び発現ベクターとしてマウス β NGFをコードするレトロウイルスベクターpMMuLV_{is}NGFを有利に含むこと特徴とする請求項1~7のいずれか1つに記載の内皮細胞系。

11. パスツール研究所により保管される国立微生物培養コレクションに1994年10月10日付けの番号I-1482で寄託していること特徴とする請求項10に記載の内皮細胞系。

12. 少なくとも1つの医薬的に受容な賦形剤と組み合わせられる、請求項1~11のいずれか1つに記載の内皮細胞系を少なくとも1つ含むことを特徴とする組成物。

13. 好ましくは $10^4 \sim 10^5$ 内皮細胞/ μ lを含むことを特徴とする請求項12に記載の組成物。

14. その方法が、

(1)最初のトランスフェクションを、

-内皮細胞、好ましくは脳の微細血管細胞を、血清と生長因子を補足した適当な培養培地で培養し、

-第2~6継代の該細胞を、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の少なくとも1つの不死化

フラグメントと適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子、特に抗生物質耐性をコードする遺伝子からなる核酸フラグメントでトランスフェクションし、必要であれば、該選択可能な遺伝子に合致する選択培地上でト

ランスフェクトされた細胞の選択を行い、

(2)次いで、(1)で得た細胞のトランスフェクションを、産生されるポリペプチド配列もしくはタンパク質配列、又は発現されるウイルスベクターを含む発現ベクターで行うことを特徴とする、請求項1～11のいずれか1つに記載の改変細胞系を得る方法。

15. 工程(2)のトランスフェクションが、発現されるタンパク質のコード配列があらかじめ組込まれているレトロウイルスベクター、好ましくはMFGベクターを用いて行うことを特徴とする請求項14に記載の方法。

16. 脳腫瘍を含む一次及び二次の神経系もしくは精神系の疾病又は疾患の処置用医薬製品を得るための、適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子との組み合わせで、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含む核酸フラグメント、及び適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子と、適切な場合に少なくとも1つのレポーター遺伝子との組み合わせでのポリペプチド、タンパク質もしくはウイルスベクターのコード配列を含む発現ベクターとからなる不死化内皮脳細胞系からなる哺乳類の内皮細胞系の使用。

17. 該内皮細胞系が、国立微生物培養コレクションに番号I-1142で寄託される不死化内皮脳細胞系であることを特徴とする請求項16に記載の使用。

18. 該内皮細胞系が、請求項1～11のいずれか1つに記載の内皮脳細胞系であることを特徴とする請求項16に記載の使用。

19. 家畜の成長と再生産の刺激用医薬製品を得るための、適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子との組み合わせで、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含む核酸フラグメント、及び適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子と、適切な場合に少なくとも1つのレポーター遺伝子との組み合わせでのポリペプチド、タンパク質もしくはウイルスベクターの

コード配列を含む発現ベクターとからなる不死化内皮脳細胞系からなる哺乳類の内皮細胞系の使用。

20. 請求項8又は9に記載の細胞系からなることを特徴とする、脳に活性物質を伝達する脳細胞における組込みの研究用モデル。

【発明の詳細な説明】内皮脳細胞の不死系とその治療上の適用

本発明は、適切に変異された哺乳類の内皮脳細胞の不死系、ならびに予防もしくは治療の使用、特に脳腫瘍を含む様々な一次及び二次の神経系もしくは精神系の疾病又は疾患の処置のための医薬製品としてのその応用に関する。

ここ何年か、以前に全ての従来処置に難治性と考えられていた多数の神経系疾病の新しい処置方法は、遺伝子治療を用いている。これらの新しい方法は、特に、有効な発現ベクターの構築とウイルスならびに細胞の転移遺伝子の輸送体の分野、及び神経系の遺伝子治療に好適な標的細胞の特徴づけの発展に関連している。

2つの異なる方法が、神経系への遺伝子転移を行うために本質的に提案されているウイルス剤と化学剤を用い、インビボの細胞への遺伝物質の直接転移を焦点とする、いわゆるインビボの方法、及び遺伝子転移を培養細胞で行い、次いで宿主に移植することを特徴とするex ビボの方法である。後者の方法は、分子操作、クローニング及び細胞移植の工程からなり、宿主内で活性物質を分布させる(シュア(SUHR) S. T. ら、Arch. Neurol., 1993, 50, 1252-1268)。

多くの神経系疾病は、神経系の病巣の病変又は機能障害に関連しており、このためにこれらの技術の試験するのに選択されている。

この分野における最初の試験は、本質的にアルツハイマー疾患

又はパーキンソン疾患のような神経変性疾患に関しており、胎児の神経組織又は副腎髄質組織の脳での脳内移植からなる(ブリュクルント(BJORKLUND) A., TINS, 1991, 14, 8, 319-322)。

ヒトの治療における細胞移植のための胎児由来の一次神経組織の使用は、多くの倫理的かつ実問題的な問題の原因である; また、神経由来の一次細胞系(例えばニューロン、神経膠細胞、星状細胞)又は非神経細胞系(例えば線維芽細胞、筋原細胞、副腎髄質のクローム親和性細胞、肝細胞)の使用も問題である(ゲイグ(GAGE) FH ら、Trends Neurosci., 1991, 14, 328-333)。副腎髄質、線維芽細胞又は筋原細胞の細胞系は、実際にインビボで活性物質を放出できるが、通常は神経系に

存在せず、神経系の通常の機能を改変し、拒絶反応を生じることができる。

実際に、脳の特定領域に制限されるか、あるいはされない脳腫瘍を含む神経系又は精神系疾病もしくは疾患の処置の目的のため、細胞のベクターが生活性物質、特にタンパク質を発現している間に神経組織に安定的に完全に統合できるようにする必要がある。

この結果、発明者の目的は、実際に生じる必要性により良く合致する細胞ベクター、特に安定的にかつインビボで、少なくとも1つのあらかじめ選択されたポリペプチドもしくはタンパク質もしくは1つのウイルスベクターを発現し、通常の脳の血管新生に組み込み得る脳由来のもので、及び十分に許容されるベクターを提供することであつた。

本発明の対象哺乳類の内皮細胞系であり、それらが、分化内

皮脳細胞の以下の特徴：

- 内皮マーカーの発現、
- 血管作用性物質の分泌、
- 主要組織適合性複合体(MHC)分子の発現、
- ホルモンレセプターの発現、及び
- 密着結合の存在、

の少なくとも1つを安定的に表す不死化内皮脳細胞からなり、適切な場合に、少なくとも1つの選択可能な遺伝子との組み合わせでの、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の少なくとも1つの不死化フラグメントからなる核酸フラグメント、及び適切な場合に少なくとも1つの選択可能な遺伝子と、適切な場合に少なくとも1つのレポーター遺伝子との組み合わせでポリペプチド、タンパク質又はウイルスベクターのコード配列を含む発現ベクターとからなり、かつインビボで宿主哺乳類の脳血管に組み込み、該ペプチド、該タンパク質又は該ウイルスベクターを産生し得ることを特徴とする。

本発明の目的のために、発現ベクターは、ゲノムに組込まれるか又は細胞質に存在し、該ポリペプチド、タンパク質又はウイルスベクターの発現を可能にするあらゆる核酸フラグメントを意味すると解する。

該系の有利な具体例によれば、癌遺伝子の不死化フラグメントを少なくとも1つ含有する核酸フラグメントは、ネオマイシン耐性遺伝子とSV40 T癌遺伝子のフラグメントを含む。

該系の他の有利な具体例によれば、癌遺伝子の不死化フラグメ

ントを少なくとも1つ含有する核酸フラグメントは、アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子を含む。

該系の別の有利な具体例によれば、該発現ベクターはレトロウイルスベクターであり、詳しくはMFGベクターである。

レトロウイルスベクターは、複製を欠くMFG-NBベクターが好ましい。

該ベクターは、詳しくはムリガン(MULLIGAN)ら(Proc. Nat. Ac. SciUSA, 1984, 81, 6349-6353)及びフェリー(FERRY)ら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 88, 8377-8381)に記載されている。

また、該内皮細胞は脳の毛細管細胞が好ましい。

非不死の一次末梢血管の内皮細胞を用いる試験は記載されているが、再生可能な移植の適用の目的のために純粋で、均一かつ十分な源を構成しておらず、内皮の脳の表現型を表わさないことから、それらは好適なベクターを構成していない。

該細胞系のさらに別の有利な具体例によれば、ポリペプチド又はタンパク質のコード配列は、プロテアーゼのような酵素、プロテアーゼ阻害剤のような酵素阻害剤、サイトカイン、神経伝達物質、ニューロトロピン、生長因子、毒素、抗代謝物、神経ホルモン、ガングリオシド、抗生物質、血栓崩壊性因子、凝固因子、血管拡張又は血管収縮神経因子、低又は高コレステロール血症因子、高又は低血糖因子、又は興味ある他のあらゆる物質をコードする配列から選択される。

本発明によれば、該内皮細胞は、不死化フラグメントとして、

アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子、及びベクターとして β -ガラクトシダーゼをコードするnls-lacZ遺伝子含有MFG-NBレトロウイルスベクターを含むのが有利である。

この細胞系を、発明者によりRBEZと名付ける。

本発明によれば、該系は、パスツール研究所により保管される国立微生物培養コレクション(the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)に1994年10月10日付けの番号I-1481で寄託している。

また、本発明によれば、該内皮細胞は、不死化フラグメントとしてアデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子、及びベクターとしてマウス β -NGFをコードするレトロウイルスベクターpMoMuLV_{is}NGFを含むのが有利である。

この細胞系を、発明者によりRBE/NGF-4と名付ける。

本発明によれば、該系は、パスツール研究所により保管される国立微生物培養コレクションに1994年10月10日付けの番号I-1482で寄託している。

予期しなかったことに、脳の毛細管のこのような内皮細胞は、脳の血管新生に十分に組み込み、非常によく許容され、自身が発現する活性物質を長い間インビボで放出しており、脳腫瘍を含む一次及び二次の神経系又は精神系疾病もしくは疾患用、又は家畜(家禽、羊、畜牛、豚、馬、ウサギ、ネズミ類など)の成長と再生産の刺激用組成物の製造における応用が見い出されている。

特に、基底核及び線条体において、本発明による多くの移植内

皮細胞は、血管局在化をしている。両方の移植部位において、有意な数の移植細胞が宿主の血管網と結合していない。この非血管局在化は、移植から1年後でさえ細胞の死の追発を引き起こさない。

本発明によれば、ウイルスベクターは、改変されたシトメガロウイルス(CMV)(組み込み性ウイルスベクター)が有利である。

本発明の対象は、少なくとも1つの医薬的に受容な賦形剤との組み合わせで、本発明による少なくとも1つの内皮脳細胞系からなることを特徴とする組成物でもある。

このような組成物は、 $10^4 \sim 10^5$ 内皮細胞/ μ lを含むことが好ましい。

このような組成物は、頭蓋内、皮下、大脳室内、硬膜下、静脈又は動脈(例えば頸動脈間)、筋肉内又は脊髄内の経路を介して有利に投与できる。

本発明によれば、該内皮細胞は、宿主と同一の種(同系移植もしくは同種移植)又は異なる種(異種移植)の細胞であってもよい。

本発明の対象は、本発明による改変細胞系を得る方法でもあり、その方法は、(1)最初のトランスフェクションを、

-内皮脳細胞、好ましくは脳の微細血管細胞を、血清と生長因子を補足した適当な培養培地で培養し、

-第2〜6継代の該細胞を、ウイルス又は細胞の癌遺伝子の少なくとも1つの不死化フラグメントと適切な場合に少なくとも1つの選

択可能な遺伝子、特に抗生物質耐性をコードする遺伝子からなる核酸フラグメントでトランスフェクションし、

-必要であれば、該選択可能な遺伝子に合致する選択培地上でトランスフェクトされた細胞の選択を行い、

(2)次いで、(1)で得た細胞のトランスフェクションを、産生されるポリペプチド配列もしくはタンパク質配列、又は発現されるウイルスベクターを含むベクターで行うことを特徴とする。

工程(2)のトランスフェクションは、発現されるタンパク質のコード配列があらかじめ組込まれているレトロウイルスベクターを用いて行うことが好ましい。

工程(1)により、SV40プロモーターの制御下でアデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドのトランスフェクションで不死化され、パスツール研究所により保管される国立微生物コレクション(the Collection National de Micro-organismes)(CNCM)に番号I-1142で寄託されるRBE4細胞を得ることが好ましい。

本発明の対象は、脳に活性物質を伝達する脳細胞での組込みの研究モデルでもあり、本発明によるREBZ細胞系を含むことを特徴とする。

本発明の対象は、インビトロの血液-脳関門の生化学的及び細胞システムを研究し、かつ同定するモデルでもあり、本発明による少なくとも1つの細胞系からなることを特徴とする。

さらに、本発明の対象は、好適なバイオリアクターにおけるポ

リペプチド又はタンパク質の産生方法であり、本発明による少なくとも1つの内皮細胞系の使用からなることを特徴とする。

前述の他に、本発明は、以下の記載から明らかになり、本発明の対象である方法の実施例ならびに添付の図に関する他のアレンジも含む：

-図1は、インサイトウハイブリダイゼーションによるRBE/NGF細胞におけるNGF転移遺伝子の発現のインビトロ研究を例証し、

-図2及び3は、インビトロのRBE/NGF細胞の上清から得られる、PC12細胞の軸索出芽の刺激を例証し、

-図4は、核染色ホクスト(Hoechst)33342(ビスベンズイミド)での移植前のRBE4細胞の予備標識を例証し、

-図5は、成体ラットの脳への移植後に、ホクスト染色で予備標識した細胞の可視化を例証し、

-図6は、RBEZ細胞の形態学的かつ機能的組込みの研究を、nls-lacZ転移遺伝子の発現と血液-脳関門(BBB)、EBA(内皮関門抗原)の組込みの抗原マーカーの可視化により例証し、

-図7は、電子顕微鏡による限外構造研究を例証し、脳内移植後のRBEZ細胞の形態学的かつ機能的組込みを、nls-lacZ転移遺伝子の発現の可視化により決定し、

-図8は、脳内腫瘍への移植後のRBEZ細胞の形態学的かつ機能的組込みの研究を、nls-lacZ転移遺伝子の発現の視覚化により例証し、

-図9は、RBEZ細胞で移植した腫瘍におけるnls-lacZ遺伝子の同定

をPCRにより例証し、

-図10は、基底核への移植から3週後のRBE/NGF細胞におけるNGF転移遺伝子の発現のインビボの研究を例証し、

-図11は、NGFメッセンジャーのインサイトウハイブリダイゼーションの内部対照として用いた対照の脳の構造をインビボで例証し、

-図12は、基底核におけるRBE/NGF細胞により分泌されたNGFの生物学的作用を移植から3週後に例証し、

-図13は、基底核とは別のRBE/NGF細胞により分泌されたNGFの生物学的作用を移

植から3週後に例証し、

-図14は、移植から3~8週後のNGF転移遺伝子の発現により誘導された生物学的作用の定量を例証し、移植領域に対するp75LNGFRの免疫標識により占有される領域を反映している。

それにもかかわらず、これらの実施例が本発明の対象の例証として挙げられているにすぎず、その限定を少しも成すものではないことは、明確に理解されるべきである。

実施例1:RBE4不死化内皮脳細胞の作製

ラットの脳の微細血管の内皮細胞（一次培養）を、アデノウイルスEIA、その後、ネオマイシン耐性遺伝子コード配列を含むプラスミドp EIA-ネオのトランスフェクションにより不死化する。

クローンRBE4はこのようにして得られ、その特徴は詳しくはPCT出願W093/06222号ならびに刊行物J. Cell. Physiol., 1993, 155, 104-111及びJ. Cell. Physiol., 1994, 159, 101-113に記載している。こ

のクローンは、国立微生物培養コレクション(CNCM)に番号I-1142で寄託した。

トランスフェクションを行うために、PCT出願W093/06222号に記載され、かつ以下に繰り返すようにリン酸カルシウム共沈技術を用いた:該細胞のトランスフェクションは、第5継代で、アデノウイルス2ゲノムのEIA初期領域とネオマイシン耐性遺伝子の他にSV 40プロモーターを含む上述のプラスミド(10 μ g)を用いて行う。

このトランスフェクションは、10%ウシ胎児血清(FCS)、1ng/ml FGFb、グルタミン(2mM)及びペニシリン/ストレプトマイシンを補足した α -MEM/F10(2/3;1/3)培地を含むコラーゲン被覆ディッシュでこれらの細胞を培養した後に生じる。得た細胞系は、内皮脳細胞の特徴の幾つかを有する;詳しくは、それは非形質転換表現型接触阻害、生長因子及び付着因子依存性増殖、内皮分化マーカー(因子VI IIに関する抗原)の発現、グリフォニアシンプリシフオリア(Griffonia simplicifolia)凝集素の結合部位、及びヌードマウスにおける腫瘍発生作用を欠く性質を有する。

さらに、これらの細胞は星状細胞により刺激され、血液-脳関門の特異的な酵素マーカー、すなわち γ -グルタミントランスフェラーゼ及びアルカリホスファターゼを発現する。

実施例2: RBEZ内皮脳細胞の作製

実施例1で得たRBE4細胞を、2mMグルタミン、10%ウシ胎児血清、1ng/ml FGFb及び300 μ g/ml G418を補足した α -MEM/F10(1/1;セロメッド、フランス)培地で一週当たり2回の継代に付す。

それらをコラーゲン被覆ディッシュ上で 10^4 細胞/ cm^2 の密度で培養し、30~60の継代を用いる。

1) レトロウイルスベクターの作製:

複製を欠き、lacZ遺伝子を含むMGF-NBベクターを、SV40 T抗原に由来する21アミノ酸の核の局在配列(nls)コード配列に融合した大腸菌 β -ガラクトシダーゼコード配列を挿入して得る(カルデロン(Kalderon)D.ら、Cell, 1984, 39, 499-509)。このベクターMGF-NB nls-lacZを、 ϕ -2レトロウイルス産生細胞に導入し(ムリガンら、上記に引用)(ϕ -2の組換えレトロウイルス感染)、 ϕ -2-MGF-NB細胞系を得ることができる。

これらのレトロウイルス産生細胞を、10%ウシ胎児血清を補足した7mlのRPMI 1640培地において、直径10mmのディッシュ当たり 10^5 細胞の密度でディッシュで培養する。

24時間後にウイルスを含む6ml量の培地をろ過し、感染に用いるか、又は使用するまで -80°C で保管する。

2) RBE4内皮細胞の感染:

RBE4細胞を 10^4 細胞/ cm^2 の密度でディッシュに培養し、24時間後にウイルス(3ml)をポリブレン(10 μ g/ml)存在下で2時間加える。

完全な培地でさらに24時間後にRBE4細胞を継代培養し、同一条件下で再感染させる。

3) 転移遺伝子を発現する内皮細胞の選択:

β -ガラクトシダーゼ発現細胞(RBEZ細胞)を、酵素の基質としてフルオレセイ

ン β -D-ガラクトピラノシド (FDG)を用いるFACS

(蛍光活性細胞分類、ノラン (NOLAN) ら、PNAS, 1988, 85, 2603-2607)により分類する。

この技術によれば、100 μ l中の 10^6 個のRBEZ細胞を5mlのポリスチレンチューブで5分間37°Cでインキュベートし、FDG (2mM)を100 μ l加える。

混合後に細胞を1分間37°Cに再び置き、次いで氷上に置いて体積を2mlに調整する。

4) 色素源基質X-galを用いる β -ガラクトシダーゼ酵素活性の可視化による転移遺伝子発現の検出:

工程:

酵素活性は、2mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド (X-gal)、20mMフェリシアンカリウム、20mMフェロシアンカリウム及び2mM $MgCl_2$ 含有PBS緩衝液中で、37°Cで細胞をインキュベートして検出する。

結果:

β -ガラクトシダーゼ酵素活性の存在は、青色呈色の形成で示される。レトロウイルスに感染したRBE4内皮細胞の約50~80%は、組織化学的状态で青色に呈色するが、呈色の段階は細胞ごとに変化する。対照 (非感染) のRBE4細胞は、同一条件下で染色されない。

5) インビトロのRBEZ細胞の特性:

得られたRBEZ細胞を、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、1ng/ml FGFb及び300 μ g/ml G418を補足した α -MEM/F10培地のコ

ラーゲン被覆支持体上で培養する。

これらの細胞は、接触阻害及び生長因子ならびに付着因子依存性増殖を表す; さらに、それらは内皮分化マーカーを発現する。

実施例3: RBE/NGF内皮脳細胞の作製

実施例1で得たRBE4細胞を、2mMグルタミン、10%ウシ胎児血清、1ng/ml FGFb及び300 μ g/ml G418を補足した α -MEM/F10 (1/1; セロメッド、フランス) 培地で一

週当り2回の継代に付す。

それらをコラーゲン被覆ディッシュ上で 10^4 細胞/cm²の密度で培養し、30～60の継代を用いる。

1) レトロウイルスベクターの作製:

方法は、実施例2のとおりであり、複製を欠き、マウス β -NGFコード配列が挿入されているレトロウイルスベクターpMoMuLV β isNGFを用いる(スコット(Scott)ら、Nature, 1983, 302, 538-540)。

ϕ -2産生細胞に導入されたこのベクターにより、 ϕ -2-MoMuLV β isNGF細胞系が得られる。

2) RBE4内皮細胞の感染:

方法は、実施例2のとおりである。

3) 2位置(two-site)ELISA法による転移遺伝子発現内皮細胞の選択:

限界希釈方法による感染RBE4細胞のサブクローニングの後、 β NGFを分泌するサブクローン(RBE/NGF細胞)を、2位置ELISAを用いて同定する(ラデンハイム(LADENHEIM)ら、J. Neurochem., 1993, 60, 260-266)。

より詳しくは、抗 β NGFモノクローナル抗体27/21(pH9.6の0.05

M炭酸緩衝液中0.1mg/ml)を、37°Cで2時間コスター(Costar)EIA/RIAプレートに用いる。該プレートを、50mM Tris-HCl、pH7.4、200mM NaCl、10mM CaCl₂、0.1%トリトンX-100及び0.05%窒化ナトリウムの混合物で3回洗浄し、条件付の培地又は1%ウシ血清アルブミンを補足した同一の緩衝液における β NGF標準(30～1000pg/ml)で一晩4°Cでインキュベートする。

洗浄後、37°Cで4時間インキュベートした後に β -D-ガラクトシダーゼに共役した同一の抗体(400mU/ml)を用いて β NGFを検出する。色素源基質は、クロロフェノール赤 β -ガラクトピラノシド(100mM Hepes中1mg/ml、pH7、150mM NaCl、2mM MgCl₂、0.1%窒化ナトリウム培地)である。570nmでの吸光度を、37°Cで2時間後に測定する。2つの高度な陽性サブクローンRBE/NGF-2と-4を選択し、ならびに2つの低度な陽性サブクローンを94個のクローンから試験する。

4) NGFコードヌクレオチド配列(mRNA)のインサイトウハイブリダイゼーションに

よるNGF合成の細胞の検出:

インサイトウハイブリダイゼーションは、マウス β NGFのcDNA配列(スコットら、1983, Nature 302, 538-540)の897~944位置に対応する、以下の式:

48マーの成熟5'-3' NGFアンチセンス配列

5' CTG CTT CTC ATC TGT TGT CAA CGC CTT GAC GAA GGTGTG AGT CGT GGT 3'

の β NGFコードヌクレオチド配列(mRNA)に特異的な48マーのア

ンチセンスプローブを用いて行い、培養中の感染細胞での β NGF転写を可視化する。これらの結果、細胞ごとに変化する段階で、感染細胞における β NGF mRNAの実質的な発現が示される。

図1は、RBE/NGF細胞におけるNGF転移遺伝子発現のインビトロ研究をインサイトウハイブリダイゼーションにより例証している。

NGF転移遺伝子発現の免疫酵素的な可視化は、マウスNGFに特異的なジゴキシゲニン標識のアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを用いて行う。これらの条件下で、mRNA/NGFプローブハイブリッドは、アルカリホスファターゼに共役した抗ジゴキシゲニン抗体で可視化され、NBT-BCIP基質複合体との酵素反応により黒味がかかった沈殿を生じる。図1Aは、培養中のRBE/NGF細胞における強度なシグナルを示し、NGF転移遺伝子の高度な発現を示唆している。1Bでは、非感染対照のRBE4細胞における陽性反応のないことが認められている(1A及び1Bでx300)(1Bは位相差)。

5) 分泌されたNGFのインビトロ活性:

RBE/NGF細胞の上清に分泌されたNGFの生物学的活性は、ラットのクロム親和細胞腫PC12細胞由来の軸索出芽を促進する特性により決定する。この試験を行うために、RBE/NGF細胞を直径100mmのディッシュに $10^4/\text{cm}^2$ の密度で培養し、密集(10^6 細胞/ディッシュ)するまで3~4日間生長させる。培地を変え(10ml)、上清を24時間後に回収する。その結果を図2及び3に例証し、24時間の細胞上清が内部標準として用いた精製NGF(0.1~50ng/ml)と同じ挙動

をし、PC12細胞の約65%で軸索出芽の刺激を誘導することを示す。さらに、該上

清の1:40希釈は、0.4ng/ml濃度のNGFに比較して生物学的活性を表す(軸索産生細胞の40%)。この結果、RBE/NGF細胞による生物学的に活性なNGFの分泌能力は、16ng/10⁶細胞/24時間と推定され得る。

これらの図2及び3は、横座標としてNGF濃度(ng/ml)(図2)又は希釈度(図3;曲線1:RBE/NGF細胞、曲線2:RBE4細胞)、縦座標として軸索産生細胞の割合を示す。

実施例4:RBE4、RBEZ及びRBE-NGF細胞の脳での移植

I. RBE4細胞:生存及び組込み:

成体ラットの脳に移植されたRBE4細胞系の特徴づけのため、ホクストビスベンズイミドを用いる予備標識方法を、移植細胞のモニターに用いる(ガンスマューラー(GANSMULLER)ら、GLIA, 1991, 4, 580-590)。

図4は、核染色ホクスト33342(ビスベンズイミド)を用いる移植前のRBE4細胞の予備標識を例証する。懸濁した細胞を、紫外線下の蛍光顕微鏡で可視化する。染色剤の蛍光により、陽性標識した細胞核が明確になる(x270)。

脳の異なる領域(灰白質及び白質)での標識RBE4細胞の移植から3~8週後、移植片は小さい小型の様相になり、その塊りの周りに幾つかのRBE4細胞を一定に広げる。この拡散は、本質的に宿主の血管網に沿って生じ、移植された内皮細胞と宿主の血管成分の優先的な相互作用を示唆する。

このようにして移植された脳の組織学的染色は、本質的に移植のための手術の外傷の後の最初の週の間に生じるので、壊死性細胞について極小のサインを示す。

移植片内で細胞密度は均一である(核凝縮細胞はほとんどないか、又はない)。星状細胞のGFAP(神経膠原線維酸性タンパク質)免疫反応特性は、移植片の周囲と移植片それ自体の両方で移植の最初の1週後から多く、移植片自体への星状細胞の浸潤を示唆している。

予期しなかったことに、移植されたRBE4細胞は、時々宿主の血管網での直接関係で血管環境において拡散し、組込まれる。

図5A、5B及び5Cは、成体ラットの脳への移植後にホクスト染色で予備標識した細胞を示す。図5Aは、脳の実質における移植領域の一般的概要を示す。蛍光の移

植された内皮細胞は、宿主の脳の血管成分の周囲に優先的に蓄積するようである。星印は、血管の経路を表象している(x250)。図5B及び5Cは、移植片の移植領域に位置する血管を高倍率で示す。5Bで、多くのホクスト陽性RBE4細胞が管腔内に組込まれ(矢印)、血管周囲の位置が認められ得る。5Cで、この同じ血管を抗ラミニン(血管の特異的マーカー)抗体で免疫標識する(x600)。

II. RBEZ細胞:生存、組込み及び転移遺伝子の発現:

1) ホクストビスベンズイミドを用いる細胞の予備標識

I 参照

2) 細胞の移植前の作製

移植方法の直前に、 $1\mu\text{g/ml}$ 濃度の MgCl_2 及び CaCl_2 及び0.1%濃度のグルコースを補足したPBS含有移植溶液で細胞を3回洗浄し、DMEM-FCS培地を除去する。

3) 細胞の手術及び移植

ルイス系に属し、体重300gの成体のオスのラットに、深部麻酔下、定位条件(コプフ(商標)定位フレーム、ラットの脳のパキノス(Paxinos)環椎)で、1)に記載するように予備標識したRBEZ細胞の移植を受けさせる。それぞれ20匹の動物が、RBEZ細胞(右脳半球)と対照のRBE4細胞(左脳半球)の基底核での定位置移植を受ける。

0.5mm直径の外部針を有するエクスマイアー(商標)の $10\mu\text{l}$ マイクロシリンジを用いて、移植溶液($3\mu\text{l}$)に懸濁した300,000個の全細胞を一部位当りに注射する。

4) 光学顕微鏡用のX-galの組織化学的可視化

麻酔にかけたラットは、150mlのPBSと、次いでPBS溶液(0.1M、pH7.4)中の4% PFA300mlとの灌流で4°Cで犠牲にする。

β -ガラクトシダーゼの存在を可視化するために、脳を低温保持切開用の化合物OCT(商標)で包含させて寒冷保護し、凍結させる。切開後、nls-lacZ転移遺伝子の酵素活性は、2mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトシド(X-gal、シグマ)、フェリシアンカリウム(20mM)、フェロシアンカリウム(20mM)及び MgCl_2 (2mM)含有PBS緩衝液で組織を37°Cでインキュベートして検出する。これらの

反応条件では、対照の動物及び移植された非改変RBE4細胞(左側に移植した細胞)で染色を生じない。組織切片中の

細胞の局在及び形態は、必要であればノマルスキー光学を用いて増大され、血管構造における細胞の型の確かな同定を可能にする。

この可視化は、必要であればより深部の細胞の特徴づけのためにEBA免疫組織化学と組み合わせられる。

図6は、nls-lacZ転移遺伝子の発現と血液-脳関門(BBB)、EBA(内皮関門抗原)の組込みの抗原マーカーの可視化による、RBEZ細胞の形態学的かつ機能的な組込みの研究を例証する。図6A、6B、6C及び6Dは、移植領域から離れて位置し、RBEZ細胞が移植後に拡散した血管を示す。これらの図において、管腔の位置(矢印)(6A、6C)で、nls-lacZ転移遺伝子を発現する内皮細胞の核が認められ得る。これらの同一の血管が、蛍光照射(6B、6D)でEBA抗原(矢印頭)を発現し、それにより移植細胞の血管挿入がBBBの組込みを損なわないことを示している(6Aと6Bで $\times 750$); (6Cと6Dで $\times 1500$); (6Aと6Cは透射対比干渉)。転移遺伝子を発現する移植細胞の割合の算出を行った。移植から1週後に、移植ホクスト陽性細胞の $6.9 \pm 0.6\%$ は β -ガラクトシダーゼを発現する。

転移遺伝子の発現は、移植から5週後までかなり上昇するが、その後に減少する。しかしながら、移植細胞の存在は上述のホクスト染色を用いて検出可能である。lacZ転移遺伝子の存在に関して宿主の免疫反応における特異的な主要な変化がないことは、これらのRBEZ細胞が適当に組込まれることを示している。

さらに、RBE4とRBEZ細胞はその表現型が非常に安定しているので、インビボで腫瘍を発生しない。

5) 電子顕微鏡用のX-galの組織化学的可視化

動物(n=10)を電子顕微鏡によるRBEZ細胞の組込みの限外構造研究用に処置した。この場合、動物は2.5%PFAと0.5%グルタルアルデヒド含有PBS溶液で灌流した。脳を除去し、同じ固定剤で一晩置く。洗浄後、それらを75 μ mの厚さの切片にバイブレードで切開する。

lacZ遺伝子を発現する細胞の可視化のために、光学顕微鏡用として、 β -ガラクトシダーゼの作用の下で電子に密集し、電子顕微鏡で可視可能な沈殿を形成する基質X-galを用いた。

移植片の予備局在は、1%OsO₄の処理前に切片で行う。その後、これらの厚い切片を脱水し、次いでイーポン(Epon)を包含させる。

その後、組織塊を半薄切片と超薄切片にウルトラマイクروتムで切開し、ウランアセテート及びクエン酸鉛で対比染色かそれ以外を行い、次いでJEOL CX100装置で調べる。

図7は、電子顕微鏡によるnls-lac転移遺伝子の発現の可視化によるRBEZ細胞の形態学的かつ機能的組込みの研究を例証する。ノマルスキー光学において、図7Aは、脳の半薄切片(2 μ m)上の移植細胞における核周囲の β -ガラクトシダーゼ標識を示している(x1600)。電子顕微鏡での調査で、細胞は実質(図7B)又は宿主の血管を形成する血管位置(図7C)のどちらかで認められる。矢印の頭は、電子に密集しているX-galの核周囲の沈殿を指す。脳の実質における組込みさえ、血液画分との直接接触がないと、これらの内皮脳細胞は長い間生存し得る。移植細胞は代謝的に活性で、そ

れら自身と宿主細胞の特殊な接合(橋小体と密着結合の存在)を確立し得るらしい。血管位置において、RBEZ細胞は、移植の1週後から通常の変現型(密着結合と極少の飲小胞)を表わす(7Bと7Cでx160,000)(L:血管腔)。

III. RBEZ細胞と脳腫瘍

1) 移植:

密集したRBEZ細胞の抗トリプシン性を破壊し、血清なしでDMEMに再懸濁後、すぐにそれらを宿主動物に移植する。

一頭蓋内の移植のため、麻酔後のフィッシャーの344匹のラット(200~250g)の尾状核と被殻に、RBEZ細胞(5x10⁵細胞)をシリンジ(ハミルトン、26ゲージ、斜角末端)を用いて定位注射する。

細胞を5 μ l量で注射し、漏れを制限するために注射後2分間針をそのままにする。

皮下移植の関係では、麻酔にかけたフィッシャーラットに、 10^6 RBEZ細胞を含む $100\mu\text{l}$ を受けさせる。

そのような細胞が腫瘍のような高血管新生領域で優先的に移植することを示すため、F98、C6又は9Lの膠種細胞(10^5 細胞)とRBEZ細胞の混合物を用いて同一の移植(頭蓋内ならびに皮下)を行う試験を、上記と同じ条件下で行う。

移植後に組織を作製し、免疫組織化学的及び組織学的研究を行う。

2) 組織の作製:

ラットをエーテルで麻酔にかけ、開胸手術後右心房を切開し、

カニューレを左心室に挿入し、次いで 120mM NaCl pH7.4のリン酸緩衝液中の 2.7mM KCl($1\text{ml}/\text{重量g}$)含有緩衝液、次いで37%パラホルムアルデヒド(固定剤)で連続的に灌流する。脳を30分間同じ固定剤に置き、PBS中30%シクロースで寒冷保護し、凍結させる。組織を切開し(厚さ $12\mu\text{m}$)、ゼラチン被覆スライドに固定する。

3) 細胞の生存と転移遺伝子の発現の立証:

a) nls-lacZレポーター遺伝子を発現するRBEZ細胞の検出のための組織化学的及び免疫組織化学的工程:

*組織化学的研究

スライド標本をPBS緩衝液で3回洗浄し、次いで $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド(X-gal)、 20mM フェリシアンカリウム、 20mM フェロシアンカリウム及び 2mM MgCl_2 含有PBSで1~2時間 37°C でインキュベートする。X-galの基質なしでインキュベートした切片を負の対照として用いる。次いで、切片をPBS緩衝液で洗浄し、 0.02% 窒化ナトリウム含有PBS中の90%グリセロールで固定する。

反応条件は、いずれのRBEZ細胞も受けていない対照動物で全く染色を生じない。

*免疫組織化学的研究

少数の切片が、X-galで染色後に、腫瘍のラミニン(腫瘍微細管の検出)、核増殖抗原Ki67及び血液-脳関門のマーカー、例えば内皮グルコース輸送体タイプ1(g

lut-1)の発現に陽性反応を表わす。

ラミニンを染色するため、切片を0.01N HCl中の0.2%ペプシンで

37°Cで15分間消化し、その後免疫学的試薬でインキュベートする。

切片を1%の通常のヤギ血清、次いでウサギ抗ラミニン抗体、ウサギ抗glut-1抗体のいずれか、もしくはウサギ抗Ki67抗体で連続的にインキュベートし、次いでビオチニル化ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンを加える(PBS中1:200)。

次いで、切片をアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(PBS中1:50)、その後0.5mg/ml 3,3'-ジアミノベンジジン(シグマ)及び0.01%過酸化水素を含む50mMトリス緩衝液でインキュベートする。

対照のスライドを免疫血清の代わりに通常のウサギ血清を用いてインキュベートする。切片をPBS中90%グリセロールで固定する。

b) 結果:

1) 移植RBEZ細胞の可視化

色素源基質X-galでの染色後、 β -ガラクトシダーゼとの反応の青色生成物を、腫瘍及びRBEZ細胞の移植後の頭蓋内及び皮下腫瘍の組織学的切片で同定する(表I及びII)。

青色でない反応生成物はRBEZ細胞なしで移植した腫瘍で検出される。驚くべきことに、移植内皮細胞は周縁浸潤を含む頭蓋内腫瘍に分布するが、通常の組織には拡散しないようである。

2) 移植RBEZ細胞の組込み

本質的に全ての β -ガラクトシダーゼ陽性細胞は、その局在性に関係なく抗ラミニン抗体で染色され、その内皮表現型に合致す

る。興味深いことに、少数の移植RBEZ細胞は、腫瘍の微細管の側面と結合する。

図8は、中性赤で対比染色した脳組織切片上の腫瘍組織(C6細胞)とその血管網(矢印頭)及びノマルスキー光学におけるRBEZ細胞の組込みを例証している。

これは、このようにして移植したRBEZ細胞が、腫瘍の血管新生に解剖学的に正しい方法で組込まれる能力を有することを示唆している。

3) 組込みRBEZ細胞の機能性

これらの内皮脳細胞のもっとも重要な特徴の一つは、血液-脳関門で発現されるグルコース輸送体タイプ1 (glut-1) の高度な発現である。これは、脳の本質的なエネルギー放出基質であるD-グルコースの内皮転移輸送体に重要である。9L又は他の頭蓋内腫瘍の内皮細胞もまた、この輸送体を発現する。逆に、glut-1の発現は、培養中の内皮脳細胞で急速に減少する。

多くの β -gal陽性細胞を抗glut-1抗体で標識する。これらの異なる試験により、ex vivoで遺伝的に改変した内皮脳細胞が生存し、頭蓋内の腫瘍に組込まれ、転移遺伝子を発現することが示される。

4) 移植RBEZ細胞の増殖

頭蓋内9L腫瘍に移植されたRBEZ細胞によるKi67増殖抗原の発現を調べる。

核 β -ガラクトシダーゼとKi67抗原の両方を発現する多くの細胞が認められる。

一腫瘍切片当りに移植したRBEZ細胞数は、イマジンリサーチインクカンパニー(ブロック、セントキャサリンズ大学、オンタリオ、カナダ)により供給されるイメージ装置(MCID)、浜松高解析CCDカメラ及びコンパックデスクプロ(Compaq DeskPro) 486/33コンピューターを用いるコンピューター補助イメージ解析により定量する。

一腫瘍当りのRBEZ細胞の全数は、一腫瘍量(12 μ mの隣接切片)当りのRBEZ細胞数から推定され、全腫瘍量は切片の2つの直交平面による腫瘍の限界から推定される。

表IとIIは、9L腫瘍における本発明による改変内皮脳細胞の移植で得た結果を例証している。

表 I

| 調べた腫瘍数 | β -gal+腫瘍の数 | RBEZ細胞の 移植後の日数 |
|--------|-------------------|-------------------|
| 4 | 4 | 7 |
| 10 | 10 | 12 |
| 4 | 4 | 14 |
| 3 | 3 | 21 |
| 3 | 3 | 28 |
| 4 | 4 | 35 |

表 II

| | 腫瘍の型(日) | RBEZ細胞/腫瘍の数 (\pm SEMを意味) |
|-----|-----------|--------------------------------|
| 頭蓋内 | 9L (D12) | 166,440 \pm 19,550 |
| | C6 (D12) | 145,840 \pm 42,160 |
| | F98 (D12) | 232,560 \pm 69,070 |
| 皮下 | 9L (D14) | 494,560 \pm 422,500 |
| | 9L (D21) | 5,252,160 \pm 611,380 |

5) RBEZ細胞で移植した腫瘍におけるnls-lacZ遺伝子のPCRによる同定

nls-lacZ遺伝子(5'-CGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATC-3')及びベクター、3'LTR配列(5'-GACCACTGATATCCTGTCTTTAAC-3')の下流に位置するDNA配列に相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる。PCRは、対照の腫瘍(9L腫瘍;図9、レーン2及び3)、実施例の腫瘍(組込みRBEZ細胞を有する腫瘍DNAの単離の14日前に移植;図9、レーン4~6)及びRBEZ(図9、レーン7)ならびにRBE4(図9、レーン8)細胞系から単離したゲノムDNAで行う。Taqポリメラーゼを用いる35増幅サイクルを、以下の条件95℃で変性、60℃でハイブリダイゼーション、72℃で伸長で行う。

図9に得た結果を示す:PCR産物(400bp)は、RBEZ細胞を含むサンプルにのみ存在する。

IV. RBE/NGF細胞

1) ホクストベンズイミドを用いる予備染色、I 参照

2) 移植:

移植方法の直前に、1 μ g/ml濃度のMgCl₂とCaCl₂及び0.1%濃度のグルコースを

補足したPBS含有移植溶液で細胞を3回洗浄し、DMEM-FCS培地を除去する。

細胞の手術と移植:

レイス系に属し、体重約300gの全50匹の成体のオスのラットを2群に分け、深部麻酔下、定位条件で、ホクスト染色で予備標識したRBE/NGF細胞の移植片を受けさせる。

10匹の動物に、右の基底核におけるRBE/NGF細胞の定位置移植を受けさせる。別の群(n=40)には、RBE/NGF細胞の多くの部位(右側)に注射の方法を付し、基底核と背面線条体の間に高さ2mmの細胞カラムを生じさせる。移植溶液(3 μ l)に懸濁した300,000の全細胞を外針直径0.5mmのエクスマイアーの10 μ lマイクロシリンジを用いて一部位あたりに注射する。

対照方法として、ホクスト染色で標識した非改変RBE4細胞も、同じ定位段階を用いて同時に反対側(左側)に移植する。移植した脳の冠側及び水平断面を、移植後1週~12ヶ月の間に回収する。ホクスト染色を用いて得た蛍光で調べられ、可視化された移植片は、細胞拡散のほとんどない小型の様相を示す。移植したRBE/NGF細胞上での腫瘍作用は認められなかった。

2)免疫組織化学用組織の作製:

移植から1週、3週、5週、8週及び1年後に、動物を麻酔にかけ、4℃でpH7.4の0.1M PBS溶液、次いで同一緩衝液中の4%パラホルムアルデヒドで心臓内を灌流させる。脳を除去し、4℃で一晩同一緩衝液に置く。次いで、脳を30%シクロース含有PBS緩衝液に4℃で2日間置き、-60℃のイソプロパンで凍結させる。冠側及び水平断面(厚さ30 μ m)を低温槽を用いて切開し、4℃のPBSで満たしたウェルで回収する。切片を異なる群に分け、免疫組織化学的解析ならびにトルイジンブルー染色を行う。

免疫組織化学的解析のために、切片を0.4% H_2O_2 含有PBSで30分間最初に処理し、同一緩衝液で洗浄する。次いで、二次抗体を産

生するのに用いたのと同じ動物の10%の通常の血清とPBS中0.1%トリトンX-100で1時間それらをインキュベートし、その後、以下の一次抗体:

-ポリクローナル一次抗体:

ウサギ抗glut-1(脳に特異的なグルコース輸送体)抗体(1:5000、バイオジェネシス);ウサギ抗GFAP抗体(1:6000、ダコ);ヤギ抗ChAT抗体(1:100、ケミコン)、ウサギ抗ラミニン抗体(1:5000、シグマ)

-モノクローナル一次抗体

マウス抗p75LNGFR(低親和性NGFレセプター)抗体(1:150、クローン192、ペーリンガー);マウス抗CD11b(ラット大食球)抗体(1:1000、クローンMRC 0X-42、セロテック);マウス抗ラットT-リンパ球抗体(1:2000、クローンMRC 0X-52、セロテック);マウス抗ラット主要組織適合性複合体 I 抗体(1:1000、クローンMRC 0X-18、セロテック);マウス抗ラットMHC群II(Ia)抗体(1:1000、クローンMRC 0X-6、セロテック);マウス抗EBA(ラットに特異的な血液-脳関門抗原)抗体(1:1000、クローンSMI71、アフィニティ)の1つを用いる。

全抗体を5%の通常の血清(ポリクローナル抗体用ロバ血清及びモノクローナル抗体用ヒツジ血清)と0.1%トリトンX-100含有PBS緩衝液で希釈し、4°Cで攪拌しながら36°Cでインキュベートする。切片を洗浄し、5%の通常血清と0.1%トリトンX-100含有PBS緩衝液中ビオチニル化ロバ抗ウサギIgG(1:2000、アマーシャム)もしくは

は抗ヤギIgG(1:1000、ジャクソンラボラトリーズ)抗体、又はビオチニル化ヒツジ抗マウス抗体IgG(1:600、アマーシャム)を用いて、4°Cで攪拌しながら一晩インキュベートする。次いで、それらを洗浄し、ビオチン-アビジン-ペルオキシダーゼ複合体(ベクターラボラトリーズ)で30分間インキュベートし、トリス緩衝液(0.1MTBS、pH7.6)で再度洗浄する。次いで、切片をTBS緩衝液(0.05M、pH7.3)中の塩化ニッケル及び過酸化水素(H_2O_2)を有するジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド溶液でインキュベートする。酵素反応を緩衝液中で切片を洗浄することにより停止する。次いで、該切片を対比染色し、脱水し、スライド上に固定して顕微鏡下で観察する。対照は常に一次抗体を割愛して行う。これらの条件下では、切片は必ず未標識である。

4) 組織の作製とインサイトウハイブリダイゼーションによるNGF転移遺伝子の検

出:

インビボの β NGF転写についての細胞の検出は、成体のラットの脳における移植から1週間ならびに以下の条件下での3、8週後の移植片におけるNGF(mRNA)のインサイトウハイブリダイゼーションにより決定する:

ケタミン(150mg/kg、イマルジェン)での深部麻酔後に、ラットを0.1M PBS緩衝液(pH7.4、4°C)中の2%パラホルムアルデヒドで灌流する。脳を除去し、4°Cで60分間この緩衝液中に置く。4°Cの0.1M PBS中15%シクロース溶液で一晩寒冷保護後、サンプルの急速凍結を-60°Cのイソペンタン中での液浸で行う。凍結した脳を

ミクロム(商標)低温槽を用いて水平に切開し(10~14 μ m)、次いでゼラチン被覆スライドに固定し、室温で乾燥させる。切片を4xSSC、1xデンハルト(Denhardt)緩衝液で40°Cで1時間プレハイブリダイゼーションさせる。ハイブリダイゼーションは、16時間37°Cの湿性チェンバーで、ハイブリダイゼーション緩衝液4xSSC、50%ホルムアミド、10%デキストランサルフェイト、1xデンハルト緩衝液、フラグメント化された変性サケ精子DNA500 μ g/ml及び最終濃度2 μ g/mlの上述のNGFプローブ含有酵母tRNA100 μ g/mlの混合物を用いて行う。スライドを20°Cで1時間2xSSCで、次いで20°Cで1時間1xSSC、37°Cで30分間1xSSC、20°Cで30分間0.5xSSCで連続的に洗浄する。ジゴキシゲニン標識したハイブリダイズプローブを、免疫酵素検出キット(ベーリンガー・マンハイム)を用いて製品の使用説明書により検出する。対照の方法は、RnaseA含有mRNAsの消化(37°Cで30分間20 μ g/ml)、又はハイブリダイゼーション混合物における過剰な未標識プローブ(40オーダーの超過)との競合のどちらかを平行して行う。プローブの0.5 μ g/mlの希釈は、弱いが特異的なシグナルを生じる。NGFプローブがハイブリダイゼーションの間に誘導されない場合には、シグナルが認められない。

この場合に、NGF転写の実質的な存在は、この転移遺伝子のLTRにより制御される構成性発現を反映して、RBE/NGF移植片で検出される。

図10は、基底核への移植から3週後のRBE/NGF細胞中のNGF転

移遺伝子の発現についてのインビボの研究を例証し、図11はNGFメッセンジャー

のインサイトウハイブリダイゼーションの内部対照として用いた対照の脳の構造を、インビボで例証している。

図10Aと10Bは、インサイトウハイブリダイゼーションにより検出したNGF転移遺伝子を強力に発現するRBE/NGF細胞の移植片(G)を示す。転移遺伝子に対するこの発現は、頭蓋内移植から3週後でも強力に残存する。図10Cは、全く陽性のNGFシグナルを表わさない、反対側の脳半球に移植した非感染RBE4細胞の対照の移植片(G)を可視化している(10Aでx130);(10Bと10Cでx270、透射対比干渉)。図11Aは、前頭頂頭皮質におけるNGFのニューロンの検出を例証し、図11Bは、海馬におけるNGFの検出を例証する(11Aでx260);(11Bでx65)。これらの図は、成体ラットにおける脳皮質及び海馬のニューロンによるNGFの内因性合成の確立された記載に一致している。

5) 基底核のコリン作動ニューロンの移植片により産生されるNGFの生物学的作用(軸策出芽作用):

NGF転移遺伝子の生物学的作用を研究するため、生成物をインビボで分泌させ、以下の機能的試験を行う: 改変細胞系を、コリン作動ニューロンがNGFに非常に感受性の反応を表わす基底核で上述のように移植する。これらのコリン作動ニューロンは、酵素ChATの発現とは別に、P75LNGFRレセプターに対する実質的な免疫反応性によっても特徴づけされ得る。後者により、特に軸策再発生の研究の間に、コリン作動線維及びその細胞体をも可視化さ

せることができる。p75LNGFRの免疫反応性で検出した出芽反応は、RBE/NGF移植片で少なくとも3週まで認められる。

最初の移植群において、基底核のコリン作動ニューロン上の移植片で産生されたNGFの生物学的作用(軸策出芽)はこの領域に局在し、後者の限界を超えては伸長しない。

図12は、基底核(NB)における移植から3週後に、RBE/NGF細胞により分泌されたNGFの生物学的作用(移植後損傷を受けたコリン作動ニューロンの反応性軸策再生長の促進及び維持作用)を例証する。12Aにおいて、NBに位置するRBE/NGF移植片の形状の一般的な概要が、ホクスト予備標識を用いて可視化されている。12B、1

2D及び12Fでは、軸策再生長上の内皮細胞により産生されたNGFの作用が、これらの軸策のNGFp75レセプターに対する強力な免疫反応性により可視化されている。この軸策の再生長は完全な長さの移植片(G)で生じ、ある血管の周囲に強力な反応性を示す(矢印)。

12Cと12Eでは、NGFレトロウイルス構造物に感染せず、反対側の脳半球のNBに位置する対照のRBE4移植片が、移植から3週後にNBのコリン作動ニューロンの反応性軸策の再生長を促進し、維持できていない(A、B、C、D、E及びFでx65、水平断面)。

しかしながら、第2群において、移植細胞で分泌されたNGFによる出芽は、背面線条体に基底核を結合している移植片に沿った腹側背側軸でより広範囲であり、それにより、NGFの栄養性(trophic)及び向性(tropic)作用を示す。図13は、基底核とは別に、

移植から3週後のRBE/NGF細胞により分泌されたNGFの生物学的作用を例証し、背面線条体の段階まで移植片に沿った、NBのコリン作動ニューロンの生長における伸長の方向生長を例証している。図13A及び13Bは、線条体における移植片の背面部位を貫通する水平断面を例証している。13Aでは、RBE/NGF細胞をホクスト核染色で可視化している。13Bにおいて、同一切片が透射光で調べられ、抗p75NGFレセプター抗体で可視化された反応性の軸策再生長が示されている(13Aと13Bでx100)。

NGF転移遺伝子の発現で誘導された生物学的作用の定量は、ガンダーソン(Gundersen) H. J. Gらの記載の方法(APMIS, 1988, 96, 379-394)により、RBE/NGF細胞とRBE4細胞の移植部位において免疫標識しているp75LNGFRにより占有された領域を算出することにより行った。移植片により占有された領域に対するこの領域の比率は、移植から3、8週後に算出し、縦座標としてp75LNGFR陽性構造により占有された領域(移植片の領域に対する割合として表現)をプロットした図14に示す。

インビボで試験した異なるクローンのうち、インビトロのNGFの2つの動産生性は、以下の表IIに要約するように生物学的作用を生じた：

表 III

移植後の時間

| クローン | 移植後の時間 | | | |
|---------------------|--------|-----|-----|------|
| | 1週 | 3週 | 8週 | 12ヶ月 |
| NGF4 生物学的作用 | 0/5 | 5/5 | 1/5 | 0/2 |
| NGF mRNA | 2/2 | 2/2 | 0/2 | |
| ホクスト+/n | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 2/2 |
| NGF4 生物学的作用 (視床) | | 0/4 | | |
| NGF2 生物学的作用 | 0/5 | 4/5 | 0/5 | 0/5 |
| NGF mRNA | 2/2 | 2/2 | 0/2 | |
| ホクスト/n | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 3/3 |

生物学的作用：移植した脳の全数に対する、RBE/NGF移植片の周囲に軸索の生長が認められた脳の数

NGF mRNA：処理した脳の全数に対する、インサイトウハイブリダイゼーションによりNGF転写が検出された脳の数

ホクスト+/n：処理した動物の全数に対する、ホクスト予備染色した内皮細胞が検出された動物の数

6) 免疫学的許容性：

移植した内細胞系に関する宿主の免疫学的反応を研究するために、主要組織適合性複合体とリンパ球の大食球のマーカーを用い

て免疫組織化学的標識を行った。

1週で、大食球の浸潤が移植部位で認められ、時間の経過とともに減少する。

この浸潤は、移植による手術の外傷に関連している。

しかしながら、リンパ球による浸潤は、移植から1ヶ月後でさえ認められない

。

これらのデータから、このような移植片は宿主に十分許容されており、移植した異なる内皮細胞系に関して急性拒絶反応を生じないことが示唆される。

上記データは、RBE4細胞のみとRBEZ細胞及びRBE/NGF細胞の両方が生存し、移植後に組込むことを示している。RBEZ及びRBE/NGF細胞は、NGFの場合に脳の生物学的作用を誘導する能力を有する該転移遺伝子の産生物を発現及び/又は分泌できる。

前述から明らかなように、本発明は、より明確に記載したにすぎない、その具体例及び実施態様ならびに願書に限定されることは決してない;逆に、それは、本発明の目的もしくは範囲から外れずに、該分野の実務者に生じ得るすべての変異型を包含するものである。

配列リスト

(1) 一般的情報

(i) 出願人:

(A) 名称: ニューロテック エスエイ

(B) 通り: リュ ドゥ ルルメル 69

(C) 都市: パリ

(E) 国: フランス

(F) 郵便番号 (ZIP): 75015

(A) 姓名: シャブロ ナタリ

(B) 通り: リュ ジャンヌダルク 10

(C) 都市: パリ

(E) 国: フランス

(F) 郵便番号 (ZIP): 75013

(A) 姓名: クロ ピエール-オリビエ

(B) 通り: リュ ドゥ ペレ 9

(C) 都市: オファルジ

(E) 国: フランス

(F) 郵便番号 (ZIP): 78610

(A) 姓名: ラテラ ジョン

(B) 通り: ハスチングロード 608

(C)都市:バルチモア

(D)州:メリーランド

(E)国:アメリカ合衆国

(F)郵便番号(ZIP):21286

(A)姓名:キノネロ ジェローム

(B)通り:クール デュ リュザール 5

(C)都市:ノワジエル

(E)国:フランス

(F)郵便番号(ZIP):77186

(A)姓名:ルー フランソワーズ

(B)通り:アベニュー ディタリ 27

(C)都市:パリ

(E)国:フランス

(F)郵便番号(ZIP):75013

(A)姓名:ストロスベール アルツール ドニ

(B)通り:リュ ドゥ ジベル 66

(C)都市:パリ

(E)国:フランス

(F)郵便番号(ZIP):75015

(A)姓名:トシェラングリアン ジャン-レオン

(B)通り:リュ ドゥ ラ ビュット-オウ-カーユ 44

(C)都市:パリ

(E)国:フランス

(F)郵便番号(ZIP):75013

(A)姓名:ビニエ リオネル

(B)通り:リュ ドンレミ 14

(C)都市:パリ

(E)国:フランス

(F)郵便番号(ZIP):75013

(ii)発明の名称:内皮細胞の不死系とその治療上の適用

(iii)配列数:3

(iv)コンピューター読み取り可能なフォーム:

(A)媒体の型:フロッピーディスク

(B)コンピューター:IBM PC コンパチブル

(C)システム:PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウェア:パテントインリリース # 1.0、

1.30バージョン(EPO)

(2)配列ID番号のための情報:1:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:48塩基

(B)型:核酸

(C)鎖:単一

(D)形状:線状

(ii)分子型:cDNAからmRNA

(xi)配列記載:配列ID番号:1:

CTGCTTCTCA TCTGTTGTCA ACGCCTTGAC GAAGGTGTGA
GTCGTGGT 48

(2)配列ID番号のための情報:2:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:24塩基

(B)型:核酸

(C)鎖:単一

(D)形状:線状

(ii)分子型:DNA(ゲノム)

(xi)配列記載:配列ID番号:2:

CGACTCCTGG AGCCCGTCAG TATC 24

(2)配列ID番号のための情報:3:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:24塩基

(B)型:核酸

(C)鎖:単一

(D)形状:線状

(ii)分子型:DNA(ゲノム)

(xi)配列記載:配列ID番号:3:

GACCACTGAT ATCCTGTCTT TAAC 24

国際出願番号 PCT/FR95/01313

微 生 物

明証書の 5 頁 5 行目に書及した微生物に関する任意用紙

A. 寄託の特定

他の寄託が別紙に記載されている。 ☒ X

寄託機関の名称

国立微生物培養コレクション

寄託機関のふて名 (郵便番号及び国名を含む)

28 リュ ドウ ドクトウール ルー、75724 パリ セデックス 15

寄託日

1994年10月10日

受託番号

I-1481

B. 追加記載 (該当しない場合には空白にしておく) この情報は添付別紙に記されている。 ☐

ヨーロッパ特許が適用する指定に関して、許可されたヨーロッパ特許の記載の刊
行まで、又は出願が拒絶もひくは取り下げされるか、又は取り下げたものとみな
される日まで、寄託微生物のサンプルは、要求者により指定された当業者に対す
るサンプルの付与によってのみ入手可能である(EPC28.4条)。

C. この記載が目的とする指定国 (すべての指定国を目的としないとき)

D. 別個の表示の届出 (該当しない場合には空白にしておく)

下記の表示は法に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

E. ☐ この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。(受理官庁が点検する

(サイン判読不可能)

(捺印のある職員)

☐ 国際事務局が(出願人から)受理した日

(捺印のある職員)

国際出願番号 PCT/FR95/01313

微生物

明細書の 5 頁 14 行目に及した微生物に関する任意用紙

A. 寄託の特定

他の寄託が別紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

国立微生物培養コレクション

寄託機関のふり仮名（郵便番号及び国名を含む）

28 リュ ドウ ドクトウール ルー、75724 パリ セデックス 15

寄託日

1994年10月10日

受託番号

I-1482

B. 追加記載（該当しない場合には空白にしておく）この情報は添付別紙に記載している。 ☐

ヨーロッパ特許が適用する指定に関して、許可されたヨーロッパ特許の記載の刊
行まで、又は出願が拒絶もひくは取り下げされるか、又は取り下げたものとみな
される日まで、寄託微生物のサンプルは、要求者により指定された当業者に対す
るサンプルの付与によってのみ入手可能である(EPC28.4条)。

C. この記載が目的とする指定国（すべての指定国を目的としないとき）

D. 別個の表示の届出（該当しない場合には空白にしておく）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

E. ☐ この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。（受理官庁が点検する）

(サイン判読不可能)

(権限のある職員)

☐ 国際事務局が（出願人から）受理した日

(権限のある職員)

【図1】



FIG. 1

【図2】

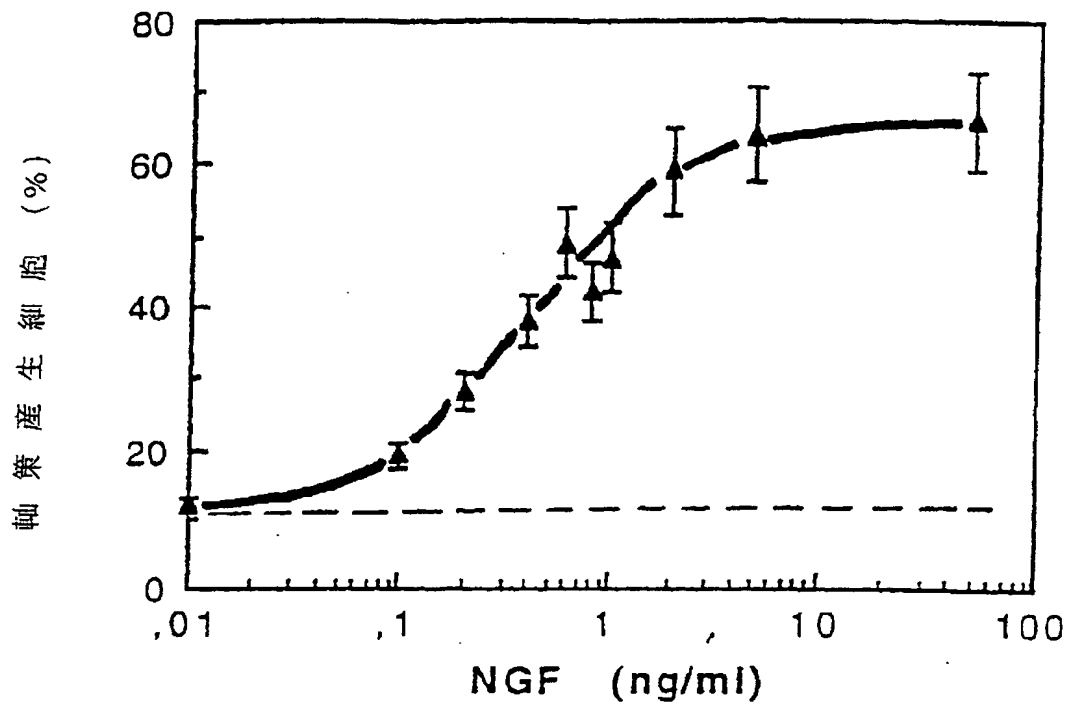


図 2

【図3】

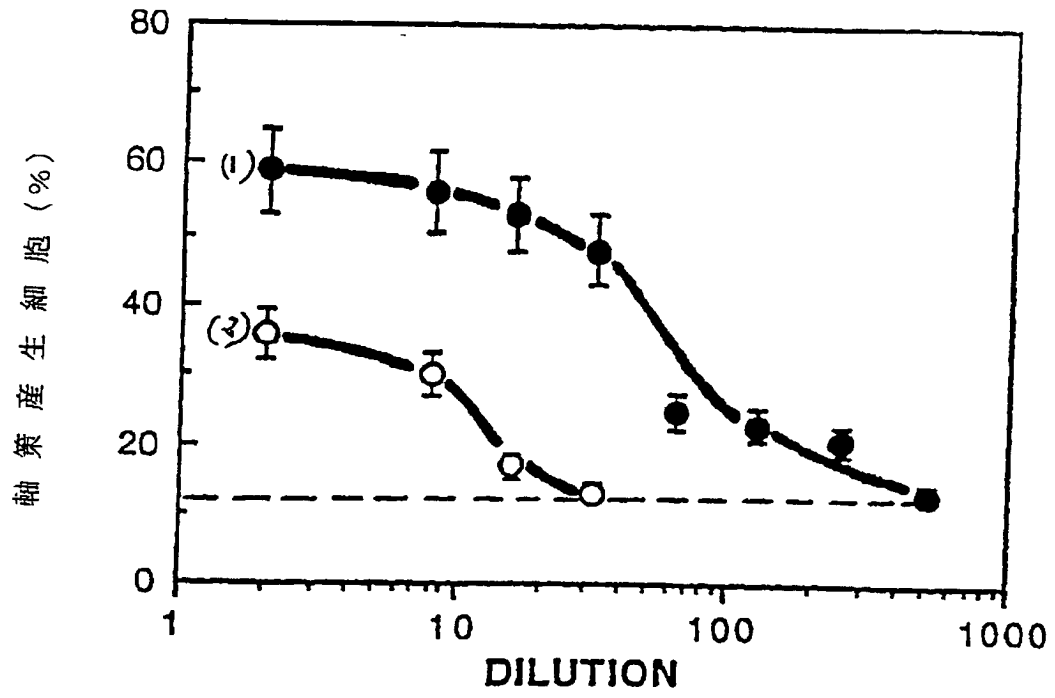


図 3

【図4】

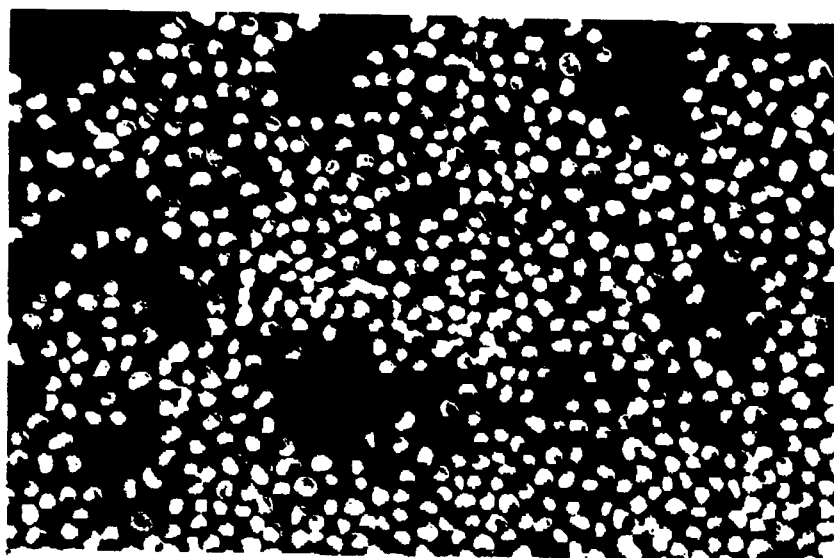


FIG. 4

【図5】

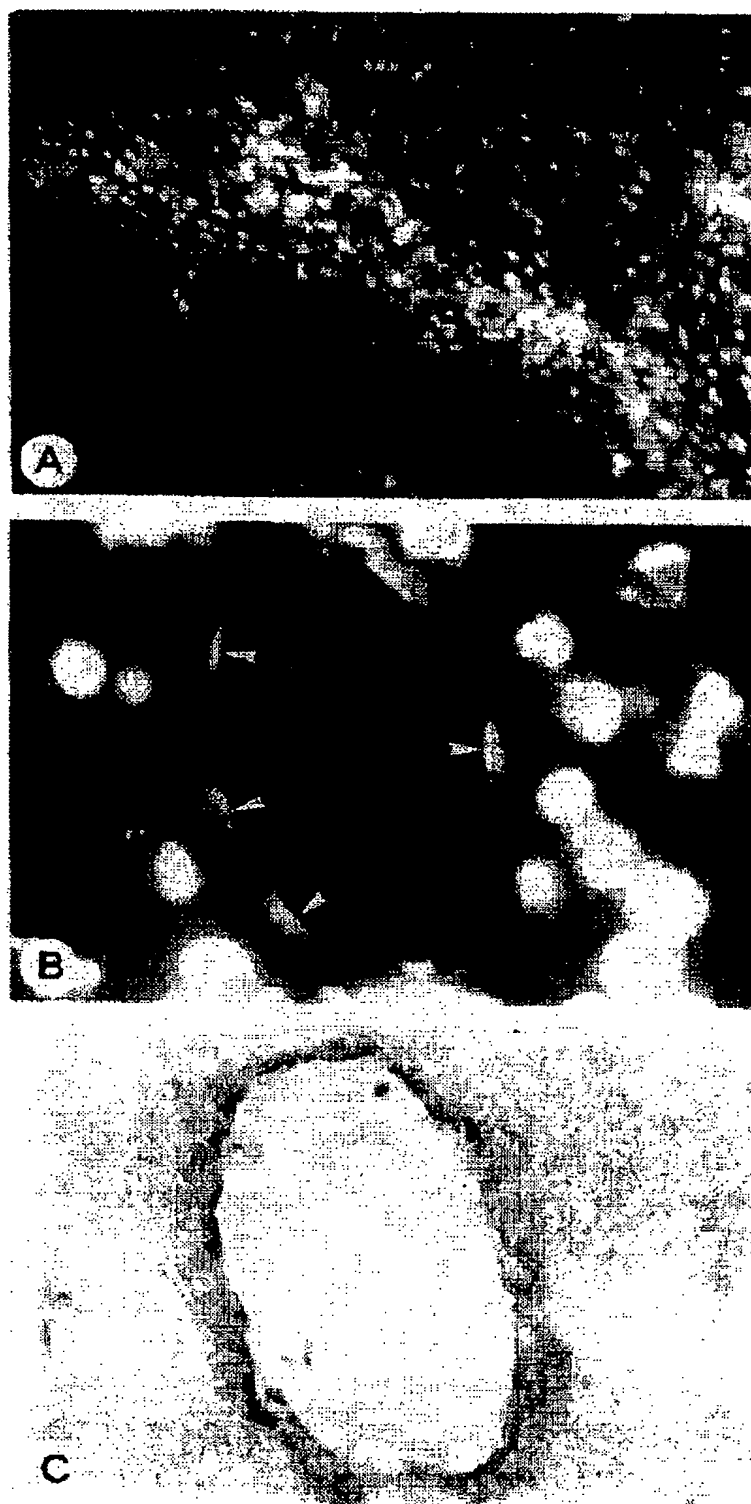


FIG. 5

【图6】

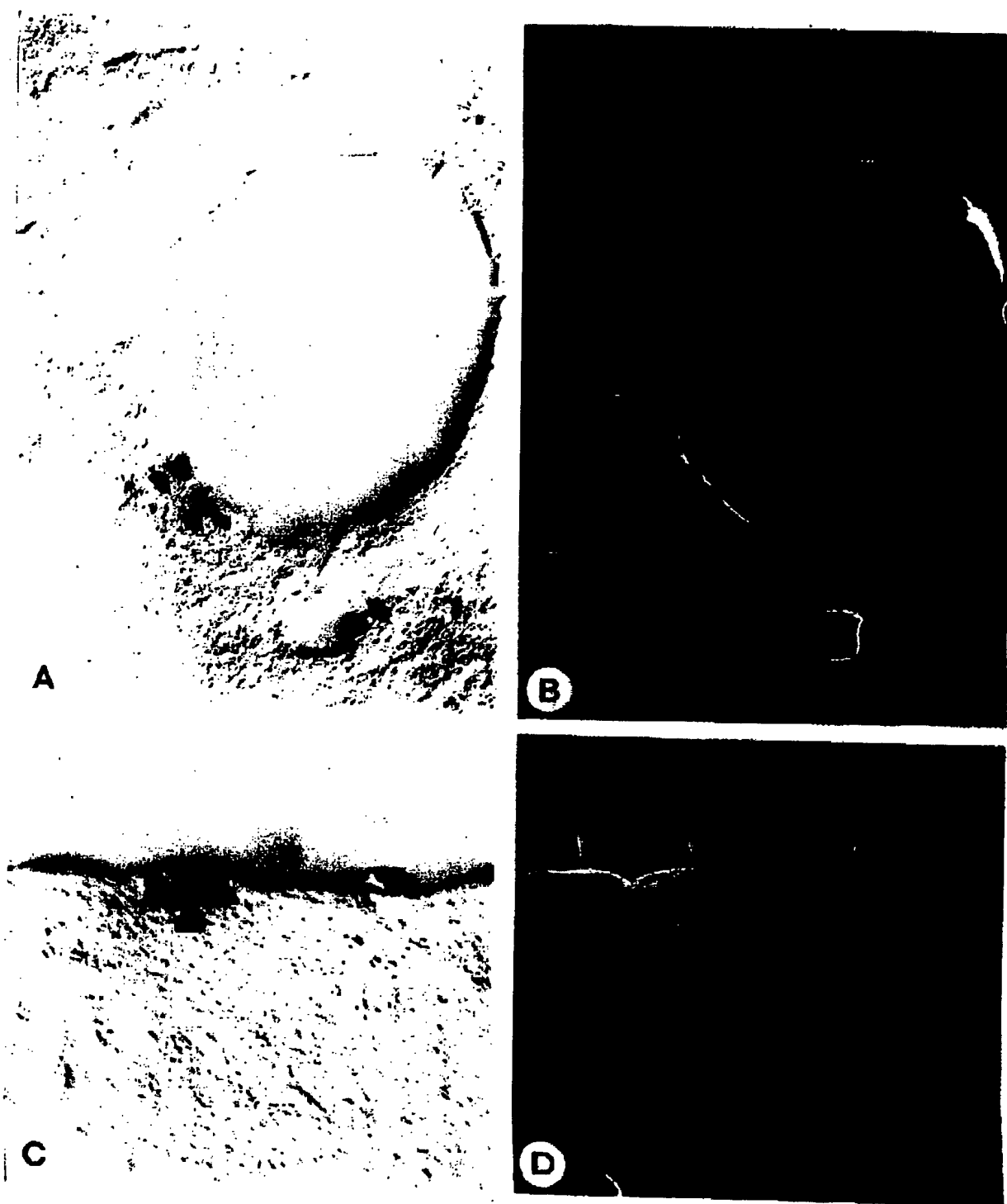


FIG. 6:

【图7】

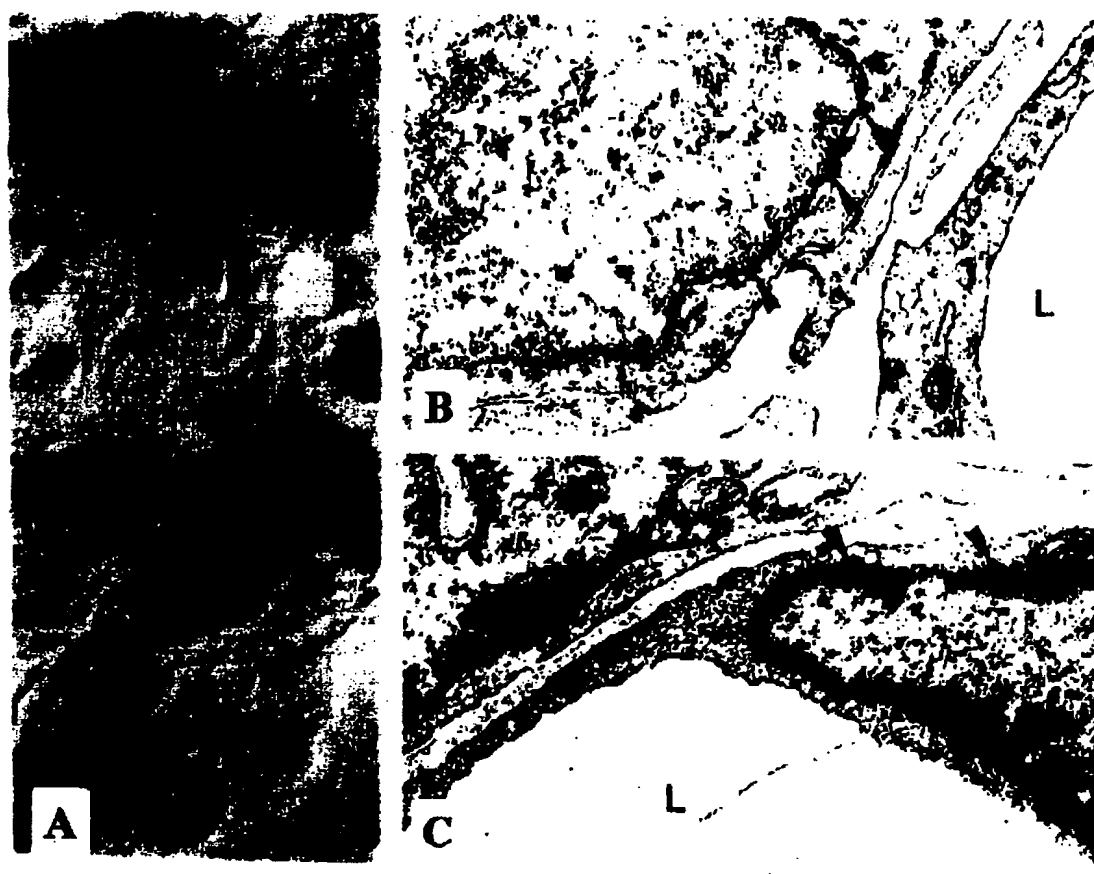


FIG. 7

【図8】

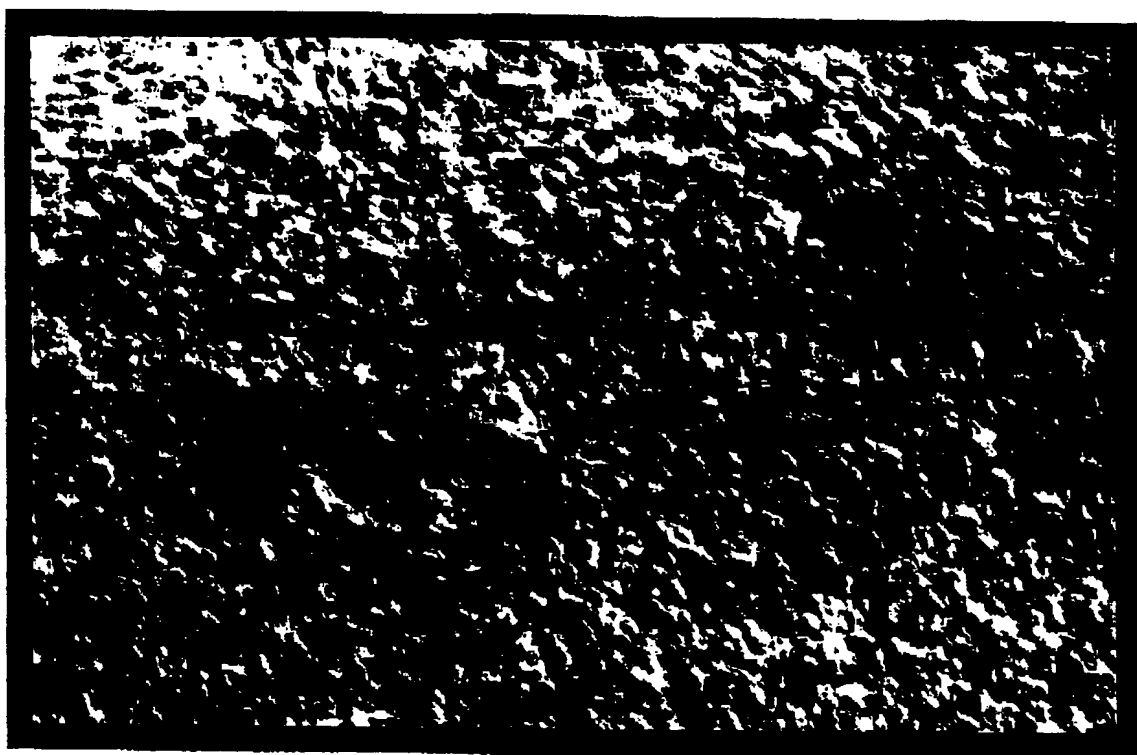


FIG. 8

【図9】



FIG. 9.

【图10】

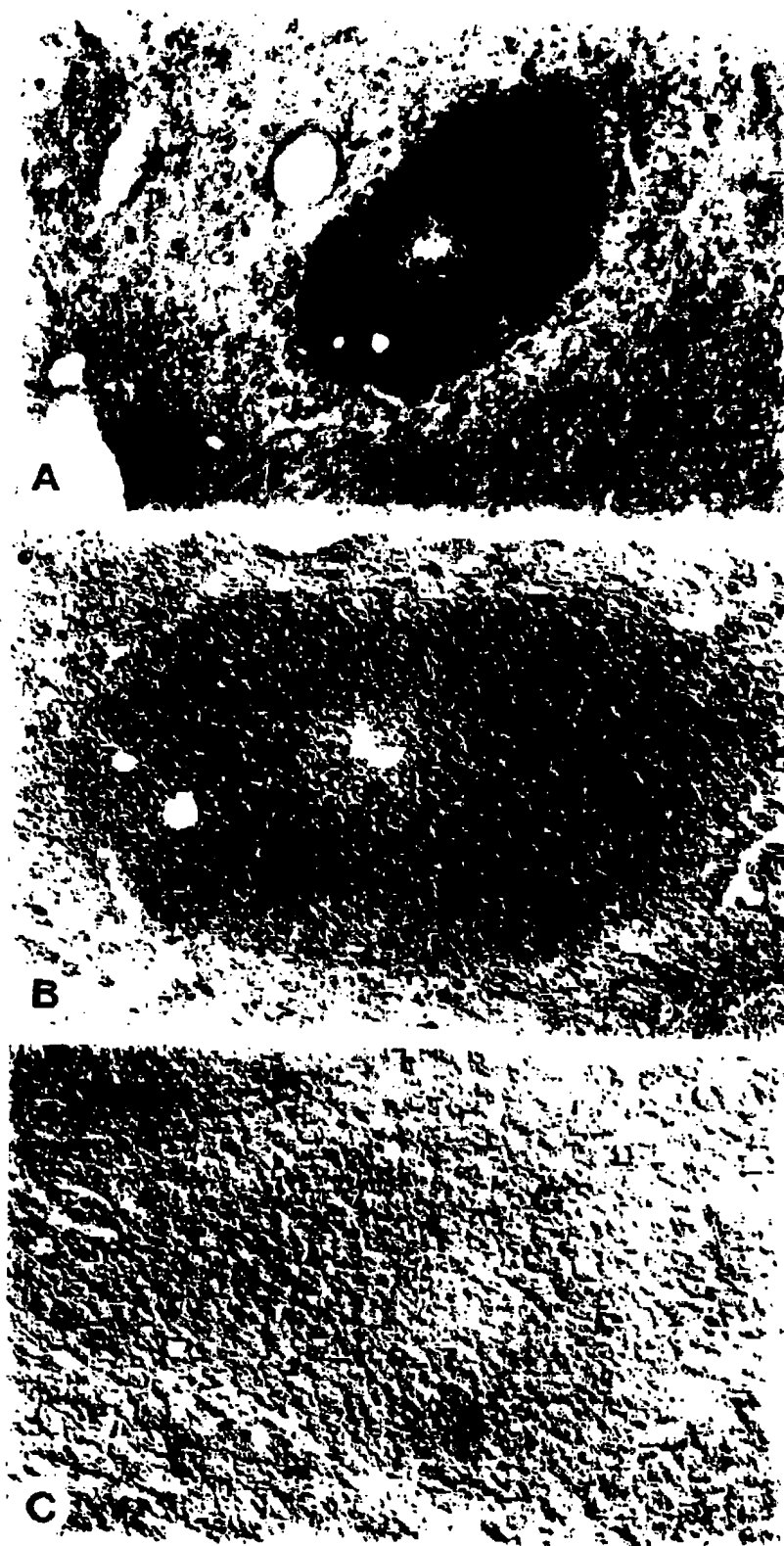


FIG. 10

【図11】



FIG. 11

【图12】

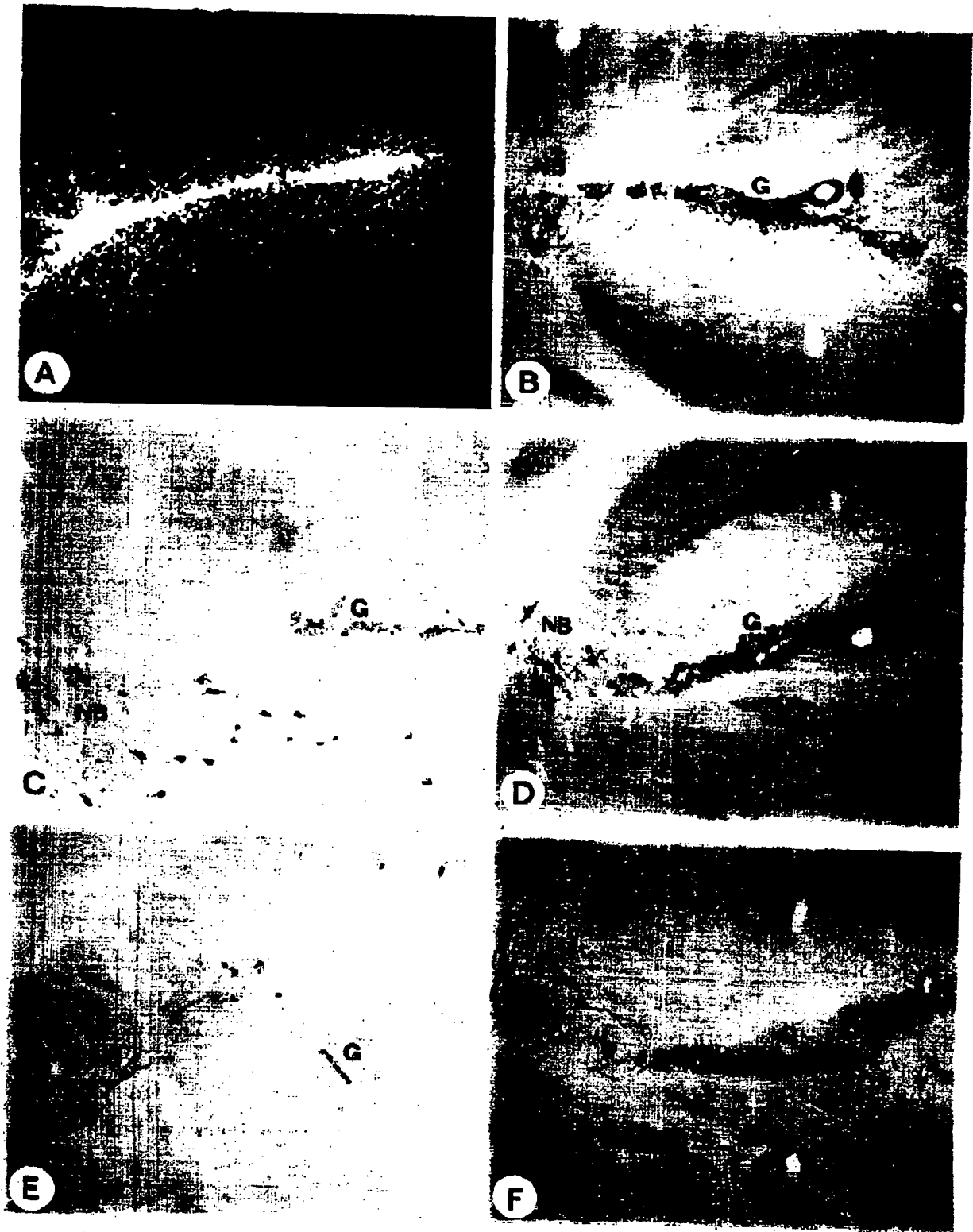


FIG. 12

【図13】

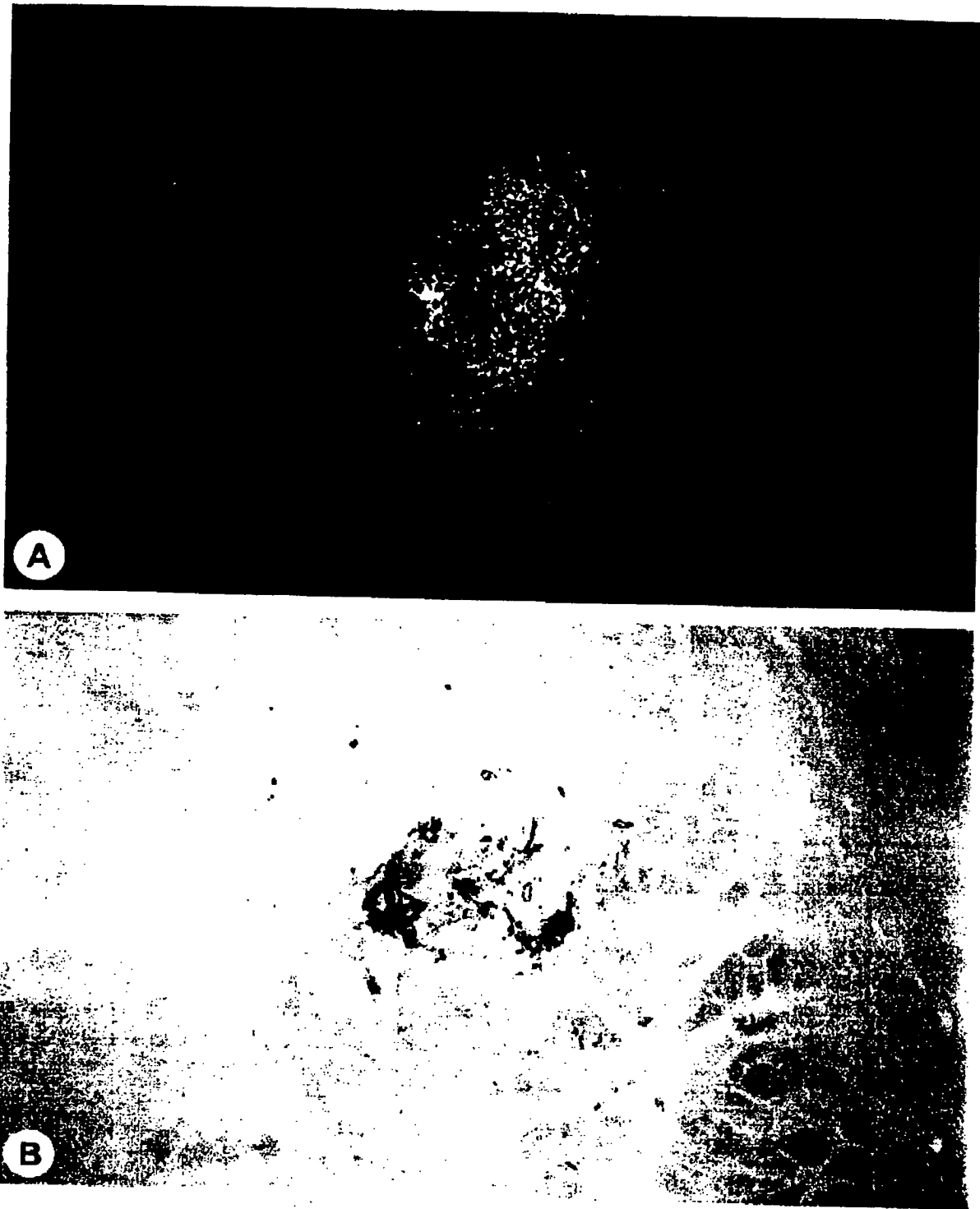


FIG. 13

【図14】

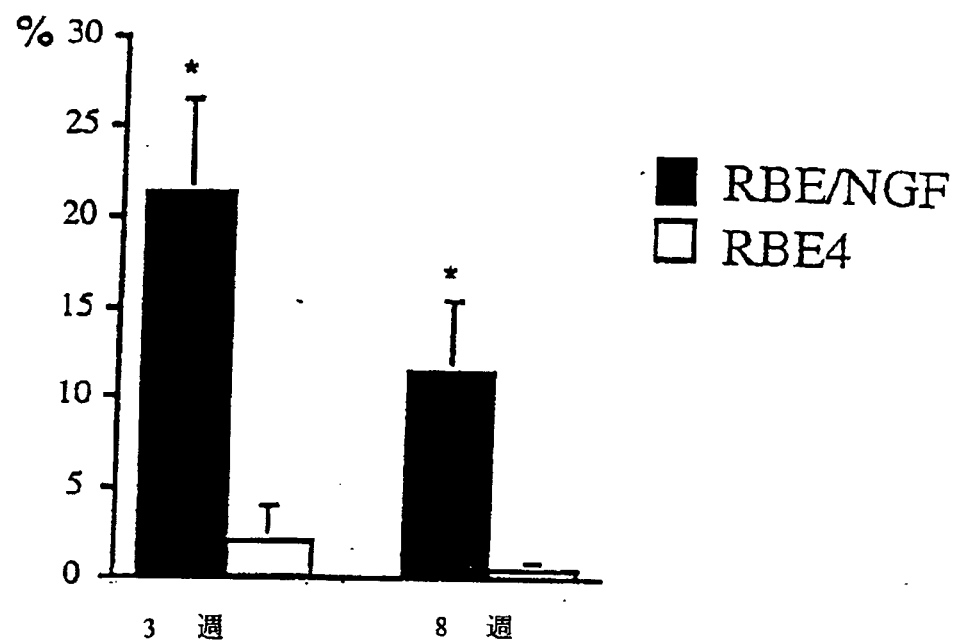


図 14

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/FR 95/01313

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 6 | C12N15/86 C07K14/82 | C12N5/10 A61K48/00 C07K14/48 C07K14/075 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC 6 C12N A61K C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 91, no. 21, 11 October 1994 WASHINGTON US, pages 9695-9699, LAL, B. ET AL. 'Endothelial cell implantation and survival within experimental gliomas' see the whole document | 1,3-5,7, 8,12-16, 18,20 |
| Y | WO,A,93 06222 (CNRS) 1 April 1993 cited in the application see the whole document | 1-20 |
| Y | WO,A,89 05345 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 June 1989 see page 31, line 22 - page 32, line 3; claims | 1-20 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 1 February 1996 | | 01.03.96 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Chambonnet, F |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCI/FR 95/01313

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WD,A,94 10305 (SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.) 11 May 1994 see the whole document --- | 1-20 |
| Y | WD,A,93 13807 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 22 July 1993 see page 2, line 4 - page 5, line 15; claims 1-3,6-8,11,12,16 --- | 1-20 |
| A | WD,A,92 17569 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES USA) 15 October 1992 see the whole document --- | 1 |
| A | WD,A,92 07573 (SOMATIX THERAPY CORPORATION) 14 May 1992 see the whole document --- | 1 |
| A | WD,A,93 14193 (YALE UNIVERSITY) 22 July 1993 see the whole document --- | 1 |
| A | IN VITRO CELL. DEV. BIOL., vol. 27A, October 1991 pages 771-778, DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium' see the whole document --- | 1 |
| A | JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 157, 1993 pages 41-51, VICART, P, ET AL. 'Cell adhesion markers are expressed by a stable human endothelial cell line transformed by the SV40 Large T antigen under vimentin promoter control' see the whole document ----- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter-
national Application No
PCT/FR 95/01313

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| WO-A-9306222 | 01-04-93 | FR-A- 2681609 | 26-03-93 |
| WO-A-8905345 | 15-06-89 | AT-T- 110108 DE-D- 3851153 DE-T- 3851153 EP-A- 0391960 JP-T- 3505036 | 15-09-94 22-09-94 05-01-95 17-10-90 07-11-91 |
| WO-A-9410305 | 11-05-94 | AU-B- 5440494 CA-A- 2143489 EP-A- 0669977 FI-A- 952088 NO-A- 951628 | 24-05-94 11-05-94 06-09-95 02-05-95 03-07-95 |
| WO-A-9313807 | 22-07-93 | AU-B- 3429993 | 03-08-93 |
| WO-A-9217569 | 15-10-92 | AU-B- 1765992 EP-A- 0578769 JP-T- 6509467 | 02-11-92 19-01-94 27-10-94 |
| WO-A-9207573 | 14-05-92 | AU-B- 659824 AU-B- 1266692 AU-B- 656544 AU-B- 9017591 CA-A- 2095153 CA-A- 2095256 EP-A- 0568537 EP-A- 0556345 JP-T- 7503121 JP-T- 6503968 WO-A- 9207943 | 01-06-95 26-05-92 09-02-95 26-05-92 01-05-92 01-05-92 10-11-93 25-08-93 06-04-95 12-05-94 14-05-92 |
| WO-A-9314193 | 22-07-93 | US-A- 5336615 AU-B- 3478193 | 09-08-94 03-08-93 |

フロントページの続き

| | | | |
|----------------------------|------|---------------|-------|
| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | F I | |
| A 6 1 K 48/00 | ADU | A 6 1 K 37/02 | A A B |
| C 1 2 N 5/10 | | 37/24 | |

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C Z, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, R U, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 ラテラ ジョン
 アメリカ合衆国 エムディ 21286、バル
 チモア、ハスチング ロード 608

(72) 発明者 キノネロ ジェローム
 フランス 77186 ノワジエル、クール
 デュ リュザール、5

(72) 発明者 ルー フランソワーズ
 フランス 75013 パリ、アベニュー ディ
 タリ、27

(72) 発明者 ストロスペール アルツール ドニ
 フランス 75015 パリ、リュ ドゥ ジ
 ベル、66

(72) 発明者 トシェラングリアン ジャンーレオン
 フランス 75013 パリ、リュ ドゥ ラ
 ビュットーオーカーユ、44

(72) 発明者 ビニエ リオネル
 フランス 75013 パリ、リュ ドンレミ、
 14